雄性大鼠交配后前两天尿蛋白质组的比较

王海彤 [1]，赵晨阳 [2]，高友鹤 [1]*
[1]（北京师范大学 生命科学学院 基因工程药物及生物技术北京市重点实验室
北京 100875）

摘要
目的：比较雄性大鼠交配行为后前两天尿液蛋白质组变化。
方法：收集 Sprague-Dawley 大鼠交配当天的尿液样品和交配隔天的尿液样品，通过高效液相色谱串联质谱联用（LC-MS/MS）的非标记定量蛋白质组学技术进行分析，筛选尿液蛋白质组的差异蛋白（FC＞1.5 或＜0.67，P<0.050）进行蛋白质功能和生物学通路分析。
结果：大鼠交配隔天与交配当天尿液蛋白质组比较可以鉴定到 43 个差异蛋白。通过 Uniprot 数据库和 Pubmed 数据库检索差异蛋白和相关文献报道，近三分之二的差异蛋白与精子发生相关。
结论：大鼠交配隔天相较于大鼠交配当天，尿液蛋白质组就发生了变化，部分变化蛋白的已知功能与精子发生相关。
关键词：尿液蛋白质组 交配 精子发生

Comparison of urinary proteome in the first two days after mating in male rats

Haitong Wang[1] Chenyang Zhao[2] Youhe Gao[1]*
[1](Gene Engineering Drug and Biotechnology Beijing Key Laboratory, College of Life Sciences，Beijing Normal University, Beijing 100871, China)

Abstract
Objective: To compare urine proteome changes in the first two days after mating behavior in male rats.
Methods: The urine samples of Sprague-Dawley rats on the day of mating and the day after mating were collected and analyzed by non-label quantitative proteomics by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), and the differential proteins (FC > 1.5 or < 0.67) in the urine proteome were screened. P<0.050) protein function and biological pathways were analyzed.
Results: 43 different proteins were identified in the urine proteome between the day after mating and the day after mating. By searching the Uniprot database and Pubmed database and related literature reports, nearly two-thirds of the differential proteins were associated with spermatogenesis.
Conclusions: The urine proteome changed the day after mating compared to the day after mating, and some of the known functions of the changed proteins were associated with spermatogenesis.
Keywords: urine proteome; mating; spermatogenesis

基金项目：北京师范大学（11100704）
作者简介：1.王海彤.（一作）(2000.4—)，女，硕士研究生，主要研究方向：尿液生物标志物。2.赵晨阳.（二作）(1998.03—)，女，硕士研究生，主要研究方向：尿液生物标志物。
通信联系人：高友鹤（1964.06—)，男，教授，博士生导师，主要研究方向：尿液蛋白质组学与尿液生物标志物.E-mail: gaoyouhe@bnu.edu.cn.

1 引言

精子发生是事至精原细胞经过增殖分化形成成熟精子的过程，涉及到染色体倍数减半和细胞形变。哺乳动物精子发生分为三个阶段。首先，精原细胞经历一系列有丝分裂形成初级精母细胞；其次，初级精母细胞通过减数分裂产生单倍体圆形精子细胞；最后，圆形精子细胞通过形变成为具有鞭毛的精子。旁分泌、自分泌和内分泌通路都有助于该过程的调节，参与调节的大量结构元件和化学因子使得在精子发生过程中连接各种细胞活动的网络是难以想象的复杂[1]。尿液是血液经肾脏过滤所产生，用以排除代谢废物，不受内环境稳态调节机制的控制，能更敏感地保留机体产生的各种微小变化[2]。已有研究表明，尿液代谢组可用于区分正常精子不育症男性和有生育能力的男性[3]。但是尚未有研究通过尿液蛋白质组对精子发生进行监测。雄性大鼠一次交配后，成熟精子经过消耗，刺激睾丸的精子发生，本研究通过收集大鼠交配后与交配当天的尿液样本，对尿液蛋白质组进行比较研究，尝试探索精子发生过程是否能够在尿液蛋白质组中反映。

2.1 实验材料

2.1.1 实验动物

10 周龄 Sprague-Dawley 雄性大鼠 5 只，10 周龄 Sprague-Dawley 雌性大鼠小鼠 5 只，购于北京华维通利华实验动物生物技术有限公司。所有大鼠在标准环境中饲养（室温（22±1）°C，湿度 65%-70%）。将所有大鼠在新环境中饲养三天后开始实验，一切实验操作遵循北京师范大学生命科学学院伦理委员会的审查和批准，批准编号为 CLS-AWEC-B-2022-003。

2.2 实验方法

2.2.1 大鼠合笼

雄鼠与雌鼠以 1：1 比例于 16：00 合笼，次日 7：00 对雌鼠进行检栓，检出阴栓者视为雌雄鼠交配。

2.2.2 尿液样本收集

雄鼠交配当日 20：00 至次日 8：00 收集尿液，暂存于-80℃冰箱，为交配当天尿液样本；收尿后雄鼠单独饲养，20：00 至第二日 8：00 继续收集尿液，暂存于-80℃冰箱，为交配隔天尿液样本。

2.2.3 尿液样本处理

尿蛋白提取：-80℃冰箱中取出大鼠尿液样本， 4°C 的条件下解冻。4℃，12000×g 离心 30 min，取 2 mL 上清液，每 500 μL 上清液于 2 mL 离心管中，加入三倍体积的预冷无水乙醇，上下颠倒轻柔混匀，-20°C 沉淀过夜蛋白。过夜沉淀的混合液 4°C，12000×g 离心 30 min，弃上清，等待乙醇挥发干燥。将蛋白沉淀重悬于裂解液中(含 8 mol/L 尿素，2 mol/L 硫脲，25 mmol/L 二硫苏糖醇，50 mmol/L Tris)。 4°C， 12000×g 离心 30 min，取上清于新的 1.5 mL 离心管内，获得尿液蛋白质。用 Bradford 法测定蛋白质浓度。

尿蛋白酶切：取 100 μg 尿液蛋白质样品于 1.5 mL 离心管中，加入 25 mmol/L NH_4HCO_3 溶液使总体积为 200 μL。加入 20 mM 二硫苏糖醇溶液（Dithiothreitol, DTT, Sigma），涡旋混匀，金属浴 97°C 加热 10 min，冷却至室温。加入 50 mM 碘乙酰胺（Iodoacetamide, IAA, Sigma），涡旋混匀，室温避光反应 40 min。 取 10 kDa 超滤管(Pall, Port Washington, NY, USA) 向滤膜上加入 200 μL UA 溶液 (8 mol/L 尿素，0.1 mol/L Tris-HCl，pH 8.5)洗涤滤膜，18°C，14000×g 离心 5 min，弃去下层滤液，重复一次；向滤

膜上加入碘乙酰胺处理完成后的尿液蛋白质样品，18℃，14000×g 离心 30 min，弃去下层滤液，尿液蛋白质留在滤膜上；向滤膜中加入 200 μL UA 溶液洗涤尿液蛋白质，18°C，14000×g 离心 30 min，重复两次；向滤膜中加入 25 mmol/L NH4HCO3 溶液洗涤尿液蛋白质，18°C，14000×g 离心 30 min，重复两次；按胰酶：蛋白为 1：50 的比例加入胰蛋白酶（Trypsin Gold, Promega, Fitchburg, WI, USA）进行酶切，37°C 水浴 15 h。酶切结束后 4℃，13000×g 离心 30 min 收集滤液，该滤液为多肽混合液。将多肽混合液通过 HLB 固相萃取柱(Waters，Milford，MA)进行除盐，使用真空干燥仪冻干，于-20°C 条件下保存。

2.2.4 LC-MS/MS 串联质谱分析

0.1%甲酸溶解多肽混合液冻干，使用 BCA 试剂盒对肽段进行定量，将肽段浓度稀释为 0.5 μg/μL。每个样品取 6 μL 混匀，使用高 pH 反相肽分离试剂盒(Thermo Fisher Scientific)进行分离。离心收集 10 份流出液（Fractions），使用真空干燥仪冻干后用 0.1%甲酸复溶。以对 10 份流出液和全部单个样品以样品 : iRT 体积比为 10 : 1 的例加入 iRT 试剂(Biognosys, Switzerland)，以校准提取的肽峰的保留时间。

10 份流出液使用 EASY-nLC1200 色谱系统(Thermo Fisher Scientific, USA)进行分离，分离的肽段经过 Orbitrap Fusion Lumos Tribrid 质谱仪(Thermo Fisher Scientific, USA)以 Data Dependent Acquisition(DDA)模式进行质谱分析并采集数据，生成 10 份 raw 文件，导入 Proteome Discoverer 软件采用 Swiss-iRT 和 Uniprot-mouse 数据库进行建库分析（version 2.0, Thermo Scientific）。根据建库结果设定单个样品 Data Independent Acquisition(DIA)模式的 39 个可变窗口建立 DIA 方法。单个样品取 1 μg 肽段，使用 EASY-nLC1200 色谱系统(Thermo Fisher Scientific, USA)进行分离，分离的肽段经过 Orbitrap Fusion Lumos Tribrid 质谱仪(Thermo Fisher Scientific, USA)以 DIA 模式进行质谱分析，采用新建立的 DIA 方法进行 DIA 采集数据，生成 raw 文件。

2.2.5 Label-free DIA 定量分析

将 DIA 模式下采集的单个样品 raw 文件导入 Spectronaut Pulsar(Biognosys AG, Switzerland)软件进行分析。由 MS2 中各片段离子的峰面积相加，计算肽段丰度。由各自的肽段丰度相加计算蛋白质丰度。

2.2.6 数据分析

每个样本进行 3 次技术重复，取平均值进行统计学分析。本实验进行前后对比，将交配当天和交配隔天进行比较，筛选差异蛋白。差异蛋白筛选条件为：组间变化倍数（FC, Fold change）≥1.5 或≤0. 67，双尾非配对 t 检验分析的 P 值＜0.05。筛选到的差异蛋白通过 Uniprot 网站（https://www.uniprot.org/）分析，并在 Pubmed 数据库（https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov）中检索相关文献，对差异蛋白进行功能分析。

3 实验结果与分析

3.1 大鼠交配隔天与交配当天尿液蛋白质组比较

3.2.1 差异蛋白

将交配隔天与交配当天尿液蛋白质进行比较，筛选差异蛋白条件为：FC≥1.5 或≤0.67，双尾非配对 t 检验 P<0.05。结果表明，交配隔天与交配当天相比，可以鉴定到 43 个差异蛋白，首先利用 STRING 数据库对鉴定到的差异蛋白进行蛋白质相互作用分析，结果如图 1 所示。接着将差异蛋白按 FC 由大到小的顺序排列，通过 Uniprot 进行检索，结果如表 1 所

示。

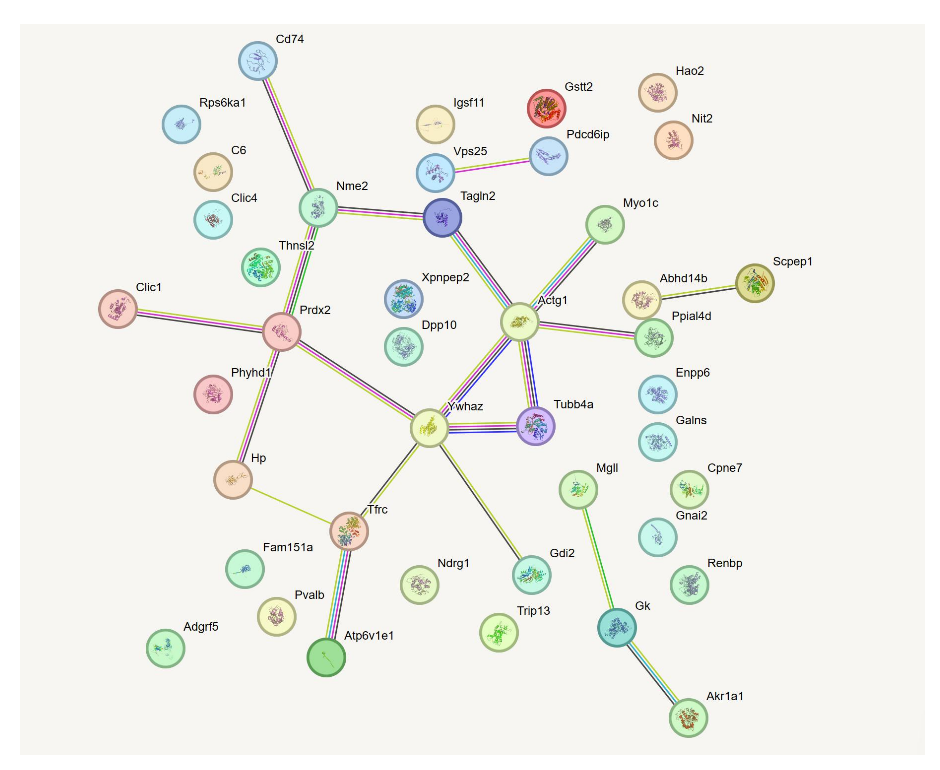


图 1 交配隔天与交配当天大鼠尿液差异蛋白相互作用

表 1 交配隔天与交配当天大鼠尿液蛋白质组差异蛋白

Uniprot ID	Protein names	Fold change	Trend	P value	Related to implantation
Q8R431	Monoglyceride lipase	13.75	↑	5.71E-03	4
P0C0A1	Vacuolar protein-sorting-associated protein 25	8.48	↑	5.31E-03	5
Q63531	Ribosomal protein S6 kinase alpha-1	7.80	↑	3.12E-02	6 7
P30713	Glutathione S-transferase theta-2	5.02	↑	2.05E-02	8 9
Q63060	Glycerol kinase	4.87	↑	6.89E-03	10
P63259	Actin, cytoplasmic 2	4.50	↑	3.11E-02	11 12 13
Q6Q629	Inactive dipeptidyl peptidase 10	4.02	↑	2.29E-02	14 15
Q63355	Unconventional myosin-Ic	3.91	↑	2.17E-02	16
P63095	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms short	3.75	↑	2.59E-02	17 18
Q5BJP9	Phytanoyl-CoA dioxygenase domain-containing protein 1	3.72	↑	3.92E-02	
P04897	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	3.60	↑	1.70E-02	19 20
Q6PCU2	V-type proton ATPase subunit E 1	3.07	↑	4.20E-04	21 22
Q9Z0W7	Chloride intracellular channel protein 4	2.92	↑	1.93E-02	23
Q6JE36	Protein NDRG1	2.76	↑	2.77E-02	24
P06866	Haptoglobin	2.73	↑	1.72E-02	25 26
Q99376	Transferrin receptor protein 1 (Fragment)	2.71	↑	1.29E-02	27 28

Q6MG61	Chloride intracellular channel protein 1	2.34	↑	2.26E-02	23
Q6P9T8	Tubulin beta-4B chain	2.33	↑	2.62E-02	29 30
Q99MA2	Xaa-Pro aminopeptidase 2	2.31	↑	3.91E-02	
Q497B0	Omega-amidase NIT2	2.24	↑	3.23E-02	
Q9QZA2	Programmed cell death 6-interacting protein	2.15	↑	3.33E-02	
H1UBN0	Copine-7	2.15	↑	4.97E-02	
Q811M5	Complement component C6	2.04	↑	3.51E-02	
P50399	Rab GDP dissociation inhibitor beta	2.03	↑	2.16E-02	31
Q6DGG1	Protein ABHD14B	1.94	↑	4.52E-02	
P51635	Aldo-keto reductase family 1 member A1	1.94	↑	1.40E-02	32 33
Q07523	Hydroxyacid oxidase 2	1.93	↑	4.56E-02	
Q5XHZ9	Pachytene checkpoint protein 2 homolog	1.90	↑	3.95E-02	34 35
Q5XFX0	Transgelin-2	1.86	↑	2.75E-02	36 37
Q32KJ6	N-acetylgalactosamine-6-sulfatase	1.85	↑	2.57E-02	
P10247	H-2 class II histocompatibility antigen gamma chain	1.85	↑	4.86E-02	
P51607	N-acylglucosamine 2-epimerase	1.84	↑	1.47E-02	
Q920A6	Retinoid-inducible serine carboxypeptidase	1.74	↑	2.10E-02	
Q9WVT0	Adhesion G protein-coupled receptor F5	1.69	↑	3.91E-02	38
Q5M7T9	Threonine synthase-like 2	1.64	↑	3.75E-03	
P63102	14-3-3 protein zeta/delta	1.60	↑	3.57E-02	39 40
P35704	Peroxiredoxin-2	1.58	↑	4.64E-02	41 42
B0BND0	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 6	1.57	↑	9.37E-03	
Q5U2P2	Immunoglobulin superfamily member 11	1.57	↑	2.19E-02	
P10111	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	1.56	↑	3.49E-02	43
P19804	Nucleoside diphosphate kinase B	1.54	↑	1.12E-02	44 45
Q642A7	Protein FAM151A	1.51	↑	3.94E-02	
P02625	Parvalbumin alpha	0.40	↓	1.07E-02	46

3.2.2 差异蛋白功能分析

将鉴定到的 43 个差异蛋白经过 PubMed 数据库进行文献检索，检索后发现其中 26 个蛋白或其家族其他成员被报道与精子发生相关。

Monoglyceride lipase 在睾丸中高度表达，作为内源性大麻素系统的一部分直接参与调节人类睾丸生理学，包括精子发生和间质细胞的功能[4]。

Vacuolar protein-sorting-associated protein 33 B 突变的秀丽隐杆线虫不育，具有分裂停滞的精母细胞，表明该蛋白参与精子特异性细胞器的形成[5]。

Ribosomal protein S6 对精子发生至关重要，在中华鲷中敲低该蛋白会导致精子发生缺陷，包括生殖细胞丢失、成熟精子滞留和空腔形成[6]。该蛋白还能通过 Akt1/2 调节支持细胞血液-睾丸屏障，进而调节 F-肌动蛋白的组织，调节细胞间界面的粘附功能，促进大鼠精子发生过程中前细线期精母细胞血液-睾丸屏障的转运[7]。

Glutathione S-transferase 在精子发生和正常精子功能中起重要作用[8]，Glutathione

S-transferase theta-1 的无效基因型与精子发生障碍有关，并可能导致中国人群对精子发生障碍和男性不育症的易感性[9]。

Glycerol kinase 2 与 Glycerol kinase 具有高度同源性，在小鼠精子发生过程中对于新月状线粒体正确排列以形成线粒体鞘至关重要，敲除该基因将导致精子鞭毛线粒体鞘紊乱[10]。

Actin 与精子发生过程中的各个方面有关，随着精子发生，Actin 细胞骨架在此过程中表现出主动重塑，参与精子细胞的塑造和分化[11 12]。然而，Actin 细胞骨架组织响应生精上皮细胞精子发生过程的分子机制在很大程度上仍未被探索[13]。

前列腺分泌名为前列腺体的含有酶的囊泡进入人类精液中。在中性或微酸性 pH 值下，前列腺体与精子发生融合，从而转移某些分子到精子中。精子中本不存在 Dipeptidyl peptidase Ⅳ酶活性，该酶从前列腺体中转移到精子，使精子获得新的膜结合酶并改变其表面的催化活性[14]。豚鼠精子含有 Dipeptidyl peptidase II，且该蛋白仅限于精子顶体内的一个隔室内[15]。

在精子发生过程中，精原细胞经历有丝分裂和减数分裂，形成通过细胞质桥保持相互连接的一束精子细胞，经过个体化后形成单个精子细胞。个体化过程涉及在精子细胞核周围形成细胞骨架蛋白和膜复合物，即个体化复合物，该复合物将共享膜分解为包围每个精子细胞的单个膜。Unconventional myosin 中的 95F myosin 是个体化复合物的组成部分，在个体化过程中参与膜重组，其功能对于个体化过程至关重要，该蛋白的部分功能丧失突变，会导致男性不育[16]。

在公羊的生殖器官中，Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha 以组织特异性和年龄依赖性方式表达，该蛋白在附睾中高水平表达，表明其可能影响附睾管腔液的组成，从而影响精子成熟的微环境，在公羊生殖系统中的精子发生以及睾丸和附睾的发育中可能发挥重要作用[17]。大鼠支持细胞不含 Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha，而该蛋白在粗线期精母细胞中高水平表达，表明其可能在精子发生的这个阶段发挥作用[18]。

在小鼠精母细胞和精子细胞中检测到 Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1、Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2、Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-3 和 Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha。当精母细胞发育成精子细胞时，Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha 水平降低[19]。Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit 与发育中的顶体的关联，可能在顶体生物发生中发挥作用；Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit 存在于哺乳动物精子的顶体区域，并且是信号转导引起顶体胞吐作用所需的复合物的一部分[19 20]。

V-type proton ATPases 在兔精子获能过程中起着重要作用[21]。大鼠圆形精子细胞通过 V-type proton ATPases、HCO_3^- 进入途径、Na^+/HCO_3^-依赖性转运系统和假定的质子传导途径调节 细胞内 pH。这些 pH 调节似乎是专门为承受酸挑战而设计的[22]。

牛附睾精子中存在 Chloride intracellular channel protein。Chloride intracellular channel protein 1、Chloride intracellular channel protein 4 和 Chloride intracellular channel protein 5 均存在于精子中，并在细胞内占据着不同的位置。它们都能够与精子中的 PP1γ2 结合，鉴于 PP1γ2 是调节精子活力的关键酶，作为 PP1γ2 结合蛋白的 Chloride intracellular channel protein 可能在精子功能中发挥重要作用[23]。

N-myc 下游调控基因 （NDRG） 家族由 NDRG-1、NDRG -2、NDRG -3 和 NDRG -4 这 4 个成员组成。Ndrg3 是导致早期胚胎发育中同源致死的关键基因，调节小鼠的雄性减数分裂。Ndrg3 表达的 NDRG3 在生殖细胞中特异性增强，并在粗线期精母细胞中达到峰值水平。在 Ndrg3 缺陷的生殖细胞，ERK 的激活减弱，减数分裂中双链断裂修复和联会复合物形成受损[24]。

Haptoglobin 是一种铁转运蛋白，在大鼠睾丸的支持细胞、间质细胞和生殖细胞中表达，但在附睾中没有表达，可能在睾丸的铁代谢中发挥重要作用。睾丸 Haptoglobin mRNA 水平

在出生后的成熟过程中稳步升高，表明其参与精子发生[25]。支持细胞在精子发生中起着关键作用，表达精子发生的主要激素调节剂促卵泡激素（FSH）和睾酮（T）的受体。FSH 刺激猪的支持细胞后，支持细胞外囊泡中抑制素-α、抑制素-β、斑珠蛋白、触珠蛋白、D-3-磷酸甘油酸脱氢酶和钠/钾转运 ATP 酶的增加[26]。

小鼠新生睾丸的蛋白质组中鉴定到了 Transferrin receptor protein，表明其参与了减数分裂。Transferrin receptor protein 对于精母细胞减数分裂的进展至关重要，特别是对于 DNA 双链断裂修复和染色体联会[27]。Transferrin receptor protein 仅在人类精母细胞和早期精子细胞中发现。在精子遗传疾病患者中，Transferrin 总是存在于支持细胞中，而 Transferrin receptor protein 仅在精母细胞存在时才被发现，在人类生精小管中，支持细胞致力于 Transferrin 的产生、储存，而精母细胞和早期精子细胞则使用 Transferrin[28]。

精子发生中的许多过程依赖于细胞骨架的动态变化、细胞器运动，特别是微管的调节。来自转基因小鼠模型的数据表明，微管动力学的协调对于男性生育能力至关重要[29]。在精子发生过程中，一种称为“nuage”的结构随着精子发生细胞的分化而出现和消失。nuage 可以分为 Irregularly Shaped Perinuclear Granule (ISPG)、Intermitochondrial Cement (IMC)、Satellite Body (SB)和 Chromatoid Body (CB)四种类型。ISPG，IMC 和 SB 在粗线期精母细胞中观察到，而 CB 在圆形精子细胞中观察到。大鼠圆形精子细胞中，β-微管蛋白从 CB 中储存的 mRNA 翻译得到，在 CB 外与 Tubulin alpha 组装形成微管的结构单元：αβ-异二聚体，来构建精子鞭毛中的微管[30]。

Rab GDP dissociation inhibitor 家族由 Rab GDP dissociation inhibitor alpha 参与肌动蛋白细胞骨架的组织，也调节细胞形态和细胞运动，该蛋白的表达在弱精子症患者降低[31]。

在睾丸发育过程中代谢特定类固醇的能力增加，如家猫睾丸发育过程中 Aldo-keto reductase family 1 member C3 的表达升高[32]。家蚕睾丸中 Aldo-Keto Reductase mRNA 水平高于其他组织，在家蚕精子发生中起着重要作用[33]。

Pachytene checkpoint protein 2 homolog 通过 Uniprot 数据库检索显示，该蛋白在男性生殖细胞核中表达，参与精子发育、精子形成、雄性减数分裂、联会复合体、减数分裂重组、双链断裂修复、减数分裂重组检查点信号通路等生物学过程。减数分裂过程中染色体重组和染色体结构发育中起关键作用。在减数分裂重组的早期介导非交叉途径，还通过影响交叉和非交叉途径来有效地完成同源染色体联会，为性染色体的有效联会所必需。小鼠 Pachytene checkpoint protein 2 是减数分裂过程中重组和正常高阶染色体结构所必需的。Pachytene checkpoint protein 2 在减数分裂，双链断裂的非交叉修复发挥潜在作用。该基因纯和突变的雄性小鼠精母细胞染色体能完全联会，但是在染色体重组过程中，因为该的缺失导致双链断裂修复缺陷无法修复，细胞在粗线期死亡，睾丸组织缺乏减数分裂后细胞[34 35]。在男性中，Pachytene checkpoint protein 2 是性染色体联会和性体(X 染色体和 Y 染色体形成的转录沉默的亚核结构域)形成所必需的[35]。

急性热应激会损害鸡睾丸中翻译、蛋白质折叠和蛋白质降解过程，从而导致细胞凋亡并干扰精子发生，经历急性热应激后，睾丸中 Transgelin 上调抵御热诱导的损伤[36]。老年动物睾丸组织中 Transgelin 基因的表达水平较低[37]。

Adhesion G protein-coupled receptor A3 是一种已知的精原干细胞标志物，55%敲除该基因的小鼠，即使具有正常的精子发生和附睾精子数量，但从青春期开始就不育[38]。

14-3-3 protein 在有丝分裂和减数分裂中都起着关键的调节作用。在小鼠中 14-3-3 protein epsilon 对正常的精子功能和男性生育能力至关重要[39]。成熟精子细胞需要从其附着的支持细胞上释放，目前鉴定到参与支持细胞和成熟精子细胞之间粘附的蛋白质包括 14-3-3 protein zeta/delta，该蛋白仅出现在精子释放过程中的小管段裂解液中。但是其在精子发生过程中的确切作用是什么，它是如何与睾丸中的其他信号转导途径相互作用或影响的现在仍然未知

[40]。

Peroxiredoxin-2 具有一些抗氧化特性，可能参与维持小鼠精子发生环境的氧化平衡[41]。Peroxiredoxin-2 也可以维持新生大鼠生殖细胞的正常发育[42]。

Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A 在环境雌激素处理小鼠的睾丸中表达上调，环境雌激素会减少男性精子数量，导致男性不育，然而其对男性不育影响的分子机制尚不清楚[43]。

Nucleoside diphosphate kinase B 分布于精子的 manchette 微管结构（细长精子中短暂出现的微管结构，其在核浓缩和精子尾部形成中发挥重要作用）。Nucleoside diphosphate kinase A 瞬时分布于圆形精子细胞核中，不对称分布在细长精子细胞核基极的细胞质中。Nucleoside diphosphate kinase 亚型可能在人类精子发生和鞭毛运动的磷酸转移网络中具有特定功能[44]。Nucleoside diphosphate kinase 通过增加小鼠细胞内抗氧化酶谷胱甘肽过氧化物酶 5 的水平以消除活性氧，在精子发生中起着关键作用[45]。

注射十一酸睾酮与口服左炔诺孕酮联合治疗增强了 Parvalbumin alpha 的表达，抑制精子发生。Parvalbumin alpha 可以防止睾丸细胞免受细胞凋亡的影响并促进细胞存活，可能是激素诱导精子发生抑制的早期分子靶标[46]。

4 展望

实验采用大鼠自身对照、两次收尿仅间隔一天，尽可能排除个体差异和自身生长发育对实验结果的干扰，因此即使样本量较小本研究结果仍能初步表明，大鼠交配当天与交配隔天尿液蛋白质组具有显著差别，且差异蛋白大多与精子发生相关，其余差异蛋白虽现未在数据库中检索到与精子发生的相关性，但本研究结果暗示这些蛋白仍可能与精子发生相关，可以作为精子发生的靶点蛋白进一步研究。本研究展示了尿液蛋白质组在研究精子发生过程的潜力，为探索精子发生异常男性致病机制的研究、靶点的发现和新的诊断手段提供了尿液蛋白质学方法，进一步实验可以考虑扩大实验动物样本量或收集临床样本进行研究；同时也反映出尿液蛋白组的灵敏性，为尿液的探索开辟新的领域。

参考文献

1 Chocu S, Calvel P, Rolland AD, Pineau C. Spermatogenesis in mammals: proteomic insights. *Syst Biol Reprod Med.* 2012, 58(4):179-90.
2 高友鹤. 尿液有可能成为生物标志物的金矿吗? *中国科学 生命科学,* 2013, 43(8): 708-708
3 Zhang J, Mu X, Xia Y, Martin FL, Hang W, Liu L, Tian M, Huang Q, Shen H. Metabolomic analysis reveals a unique urinary pattern in normozoospermic infertile men. *J Proteome Res.* 2014, 13(6):3088-99.
4 Nielsen JE, Rolland AD, Rajpert-De Meyts E, Janfelt C, Jørgensen A, Winge SB, Kristensen DM, Juul A, Chalmel F, Jégou B, Skakkebaek NE. Characterisation and localisation of the endocannabinoid system components in the adult human testis. *Sci Rep.* 2019, 19;9(1):12866.
5 Gengyo-Ando K, Kage-Nakadai E, Yoshina S, Otori M, Kagawa-Nagamura Y, Nakai J, Mitani S. Distinct roles of the two VPS33 proteins in the endolysosomal system in Caenorhabditis elegans. *Traffic.* 2016, 17(11):1197-1213.
6 Li ZF, Qi HY, Wang JM, Zhao Z, Tan FQ, Yang WX. mTORC1/rpS6 and mTORC2/PKC regulate spermatogenesis through Arp3-mediated actin microfilament organization in Eriocheir sinensis. *Cell Tissue Res.* 2023, 393(3):559-575.
7 Mok KW, Chen H, Lee WM, Cheng CY. rpS6 regulates blood-testis barrier dynamics through

Arp3-mediated actin microfilament organization in rat sertoli cells. An in vitro study. *Endocrinology.* 2015, 156(5):1900-13.
8 Yu B, Huang Z. Variations in Antioxidant Genes and Male Infertility. *Biomed Res Int.* 2015, 2015:513196.
9 Xu XB, Liu SR, Ying HQ, A ZC. Null genotype of GSTM1 and GSTT1 may contribute to susceptibility to male infertility with impaired spermatogenesis in Chinese population. *Biomarkers.* 2013, 18(2):151-4.
10 Shimada K, Kato H, Miyata H, Ikawa M. Glycerol kinase 2 is essential for proper arrangement of crescent-like mitochondria to form the mitochondrial sheath during mouse spermatogenesis. *J Reprod Dev.* 2019, 65(2):155-162.
11 Sun X, Kovacs T, Hu YJ, Yang WX. The role of actin and myosin during spermatogenesis. *Mol Biol Rep.* 2011, 38(6):3993-4001.
12 Xiao X, Yang WX. Actin-based dynamics during spermatogenesis and its significance. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2007, 8(7):498-506.
13 Wang L, Yan M, Wu S, Wu X, Bu T, Wong CKC, Ge R, Sun F, Cheng CY. Actin binding proteins, actin cytoskeleton and spermatogenesis - Lesson from toxicant models. *Reprod Toxicol.* 2020, 96:76-89.
14 Arienti G, Polci A, Carlini E, Palmerini CA. Transfer of CD26/dipeptidyl peptidase IV (E.C. 3.5.4.4) from prostasomes to sperm. *FEBS Lett.* 1997, 410(2-3):343-6.
15 Talbot P, Dicarlantonio G. Cytochemical localization of dipeptidyl peptidase II (DPP-II) in mature guinea pig sperm. *J Histochem Cytochem.* 1985, 33(11):1169-72.
16 Hicks JL, Deng WM, Rogat AD, Miller KG, Bownes M. Class VI unconventional myosin is required for spermatogenesis in Drosophila. *Mol Biol Cell.* 1999, 10(12):4341-53.
17 Li Z, Lu J, Chen J, Pang Q, Nan R, Zhu Z. Expression and localization of guanine nucleotide-binding protein alpha S in the testis and epididymis of rams at different developmental stages. *Anim Reprod Sci.* 2017, 178:31-39.
18 Paulssen RH, Paulssen EJ, Gordeladze JO, Hansson V, Haugen TB. Cell-specific expression of guanine nucleotide-binding proteins in rat testicular cells. *Biol Reprod.* 1991, 45(4):566-71.
19 Karnik NS, Newman S, Kopf GS, Gerton GL. Developmental expression of G protein alpha subunits in mouse spermatogenic cells: evidence that G alpha i is associated with the developing acrosome. *Dev Biol.* 1992, 152(2):393-402.
20 Glassner M, Jones J, Kligman I, Woolkalis MJ, Gerton GL, Kopf GS. Immunocytochemical and biochemical characterization of guanine nucleotide-binding regulatory proteins in mammalian spermatozoa. *Dev Biol.* 1991, 146(2):438-50.
21 García-MacEdo R, Rosales AM, Hernández-Pérez O, Chavarría ME, Reyes A, Rosado A. Effect of bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar (V-type) proton ATPases, on the capacitation of rabbit spermatozoa. *Andrologia.* 2001, 33(2):113-21.
22 Osses N, Pancetti F, Benos DJ, Reyes JG. Intracellular pH regulation in rat round spermatids. *Biol Cell.* 1997, 89(4):273-83.
23 Myers K, Somanath PR, Berryman M, Vijayaraghavan S. Identification of chloride intracellular channel proteins in spermatozoa. *FEBS Lett.* 2004, 566(1-3):136-40.
24 Pan H, Zhang X, Jiang H, Jiang X, Wang L, Qi Q, Bi Y, Wang J, Shi Q, Li R. Ndrg3 gene regulates DSB repair during meiosis through modulation the ERK signal pathway in the male germ cells. *Sci Rep.* 2017, 7:44440.

25 O'Bryan MK, Grima J, Mruk D, Cheng CY. Haptoglobin is a Sertoli cell product in the rat seminiferous epithelium: its purification and regulation. *J Androl.* 1997, 18(6):637-45.
26 Mancuso F, Calvitti M, Milardi D, Grande G, Falabella G, Arato I, Giovagnoli S, Vincenzoni F, Mancini F, Nastruzzi C, Bodo M, Baroni T, Castagnola M, Marana R, Pontecorvi A, Calafiore R, Luca G. Testosterone and FSH modulate Sertoli cell extracellular secretion: Proteomic analysis. *Mol Cell Endocrinol.* 2018, 476:1-7.
27 Gao T, Lin M, Wu Y, Li K, Liu C, Zhou Q, Shen C, Zheng B, Huang X. Transferrin receptor (TFRC) is essential for meiotic progression during mouse spermatogenesis. *Zygote.* 2021, 29(2):169-175.
28 Vannelli BG, Orlando C, Barni T, Natali A, Serio M, Balboni GC. Immunostaining of transferrin and transferrin receptor in human seminiferous tubules. *Fertil Steril.* 1986, 45(4):536-41.
29 O'Donnell L, O'Bryan MK. Microtubules and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2014, 30:45-54.
30 Fujii Y, Fujita H, Yokota S. Synthesis of β-tubulin occurs within chromatoid body of round spermatids. *Cytoskeleton (Hoboken).* 2017, 74(5):197-204.
31 Dyrda K, Orzołek A, Ner-Kluza J, Wysocki P. Is stallion epididymal fluid phosphoproteome affected by the equine reproductive season? *Pol J Vet Sci.* 2021, 24(4):487-495.
32 Braun BC, Okuyama MW, Müller K, Dehnhard M, Jewgenow K. Steroidogenic enzymes, their products and sex steroid receptors during testis development and spermatogenesis in the domestic cat (Felis catus). *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018, 178:135-149.
33 Yamamoto K, Ozakiya Y, Uno T. Localization of an Aldo-Keto Reductase (AKR2E4) in the Silkworm Bombyx mori (Lepidoptera: Bombycidae). *J Insect Sci.* 2017, 17(5):94.
34 Li XC, Schimenti JC. Mouse pachytene checkpoint 2 (trip13) is required for completing meiotic recombination but not synapsis. *PLoS Genet.* 2007, 3(8):e130.
35 Roig I, Dowdle JA, Toth A, de Rooij DG, Jasin M, Keeney S. Mouse TRIP13/PCH2 is required for recombination and normal higher-order chromosome structure during meiosis. *PLoS Genet.* 2010, 6(8):e1001062.
36 Wang SH, Cheng CY, Chen CJ, Chen HH, Tang PC, Chen CF, Lee YP, Huang SY. Changes in protein expression in testes of L2 strain Taiwan country chickens in response to acute heat stress. *Theriogenology.* 2014, 82(1):80-94.
37 Schmidt JA, de Avila JM, McLean DJ. Analysis of gene expression in bovine testis tissue prior to ectopic testis tissue xenografting and during the grafting period. *Biol Reprod.* 2007, 76(6):1071-80.
38 Nybo ML, Kvam JM, Nielsen JE, Frederiksen H, Spiess K, Jensen KHR, Gadgaard S, Walser ALS, Thomsen JS, Cowin P, Juul A, Blomberg Jensen M, Rosenkilde MM. Loss of Adgra3 causes obstructive azoospermia with high penetrance in male mice. *FASEB J.* 2023, 37(2):e22781.
39 Eisa A, Dey S, Ignatious A, Nofal W, Hess RA, Kurokawa M, Kline D, Vijayaraghavan S. The protein YWHAE (14-3-3 epsilon) in spermatozoa is essential for male fertility. *Andrology.* 2021, 9(1):312-328.
40 Chapin RE, Wine RN, Harris MW, Borchers CH, Haseman JK. Structure and control of a cell-cell adhesion complex associated with spermiation in rat seminiferous epithelium. *J Androl.* 2001, 22(6):1030-52.
41 Xu GL, Ye XL, Vashisth MK, Zhao WZ. Correlation between PRDX2 and spermatogenesis

under oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 2023, 656:139-145.
42 C. O'Flaherty, A. Boisvert, G. Manku, et al.Protective role of peroxiredoxins against reactive oxygen species in neonatal rat testicular gonocytes. *Antioxidants.* 2019, 9(1):32.
43 Li E, Guo Y, Ning Q, Zhang S, Li D. Research for the effect of octylphenol on spermatogenesis and proteomic analysis in octylphenol-treated mice testes. *Cell Biol Int.* 2011, 35(4):305-9.
44 Munier A, Serres C, Kann ML, Boissan M, Lesaffre C, Capeau J, Fouquet JP, Lacombe ML. Nm23/NDP kinases in human male germ cells: role in spermiogenesis and sperm motility? *Exp Cell Res.* 2003, 289(2):295-306.
45 Choi YJ, Cho SK, Hwang KC, Park C, Kim JH, Park SB, Hwang S, Kim JH. Nm23-M5 mediates round and elongated spermatid survival by regulating GPX-5 levels. *FEBS Lett.* 2009, 583(8):1292-8.
46 Cui Y, Zhu H, Zhu Y, Guo X, Huo R, Wang X, Tong J, Qian L, Zhou Z, Jia Y, Lue YH, Hikim AS, Wang C, Swerdloff RS, Sha J. Proteomic analysis of testis biopsies in men treated with injectable testosterone undecanoate alone or in combination with oral levonorgestrel as potential male contraceptive. *J Proteome Res.* 2008, 7(9):3984-93.